

## Micropropagación *in vitro* de *Rosa rosa* sp. a partir de yemas axilares y respuesta callogénica

*Rosa rosa* sp. *in vitro* micropropagation from axillary buds and callogenic response

Rigoberto Villa Ramírez<sup>1</sup>, Lina María Arbeláez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agroindustriales, Grupo de Investigación en Ciencias Agropecuarias, Universidad del Quindío, Quindío Colombia

Recibido: Marzo 20 de 2019

Aceptado: Julio 5 de 2019

\*Correspondencia del autor: Rigoberto Villa Ramírez. Facultad de Ciencias Agroindustriales

E-mail: rivilla@uniquindio.edu.co



### Resumen

El objetivo de este trabajo fue obtener plántulas de *Rosa sp* y respuesta callogénica a partir de yemas axilares y hojas. Se utilizó Murashige y Skoog (MS) al 100%, como medio de cultivo para la fase de establecimiento, adicionado con myo-inositol 0,1 mg/L, ácido ascórbico 0,1 mg/L, tiamina 0,2 mg/L, sacarosa 30 g, benzylaminopurina (BAP) 0,4 mg/L, kinetina 0,3 mg/L, ácido naftaleno-acético (ANA) 0,3 mg/L, y Agar sigma 6 g; ajustando el pH a 5,8; esterilizados en autoclave a 120°C bajo 15 lb de presión. El análisis de varianza para la fase de multiplicación y enraizamiento determinó que existen diferencias altamente significativas para la variable altura ( $p=0,000$ ), para determinar en cuáles medias son significativamente diferentes se realizó la prueba de Kruskal – Wallis. Para las variables presencia de raíz ( $p = 0,3398$ ), número de hojas ( $p = 0,4775$ ) y formación de callos ( $p = 0,1964$ ), sin diferencias estadísticamente significativas.

**Palabras clave:** hormonas, medio de cultivo, yemas, callogénesis, respuesta, propagación

## Abstract

The objective of this work was to obtain *Rosa sp* seedlings and callogenic response from axillary buds and leaves. Murashige and Skoog (MS) 100%, was used as culture medium for the establishment phase, added with myo-inositol 0.1 mg / L, ascorbic acid 0.1 mg / L, thiamin 0.2 mg / L, sucrose 30 g, benzylaminopurine (BAP) 0.4 mg / L, kinetin 0.3 mg / L, indole-acetic acid (IAA) 0.3 mg / L, and Sigma agar 6 g; adjusting the pH to 5.8; sterilized in an autoclave at 120 °C under 15 lb of pressure. The analysis of variance for the phase of multiplication and rooting determined that there are highly significant differences for the variable height ( $p = 0.000$ ), in order to determine which means are significantly different, the Kruskal - Wallis test was performed. For the variables presence of root ( $p = 0.3398$ ), number of leaves ( $p = 0.4775$ ) and callus formation ( $p = 0.1964$ ), without statistically significant differences

**Keywords:** hormones, culture medium, yolks, callogenesis, answer, propagation

## Introducción

Las Rosaceae son una familia que contiene muchas especies variadas, la mayor parte se encuentra cultivada en la zona templada del hemisferio norte, y en las que se incluye no más de un centenar de géneros y cerca de 3000 especies. Son arbustos leñosos con hojas compuestas que brotan en disposición espiral sobre los tallos. Los brotes o tallos habitualmente tienen algunas hojas labiales en la base (1).

El género *Rosa* contiene un sin número de especies arbustivas con florescencias, y es el principal representante de la familia Rosácea. Se designa rosa a la flor y rosal a la planta (2); además, se identifica por tener una gran variedad de colores, formas y tamaños. En la actualidad la rosa es la planta ornamental más cultivada y preciada como flor cortada por partes de los consumidores (3).

Los cultivos de rosa son de gran importancia a nivel nacional e internacional por su gran atractivo ornamental, además son un sector importante en la economía del país ya que son muy apetecidos en el exterior lo que lo convierte en uno de los principales cultivos de exportación.

Colombia cuenta con zonas aptas para sus cultivos lo que lo ubica como uno de los mejores productores del mismo. La producción de flores en Colombia se reserva principalmente a la exportación, siendo el país el segundo exportador en el mundo después de Holanda y representando el 14% del valor mundial de las exportaciones del producto en 2004 (4).

Colombia contribuye con el 95% de la oferta total de flores y 50% en la de rosas en el mercado de los Estados Unidos. Las exportaciones pertenecen a flores cortadas (rosas y claveles principalmente) (5).

La propagación se puede llevar a cabo por semillas, estacas, injertos de varetas, e injertos de yema, este último el método más empleado a nivel comercial; la reproducción por semillas está limitada a la obtención de nuevos cultivares. Sin embargo, existen también otras técnicas, como las del cultivo de tejidos que permiten la rápida introducción de variedades de rosas, así como la mejora por mutagénesis y selección *in vitro* (6).

El cultivo de tejidos se puede precisar como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales. Otras ventajas consisten en que viabilizan aumentar el coeficiente de multiplicación, producir independientemente de las condiciones ambientales existentes y facilitar la comercialización de las especies vegetales (6).

Entre las técnicas del cultivo de tejidos más empleadas para la propagación *in vitro* de las rosas, se encuentran el cultivo de yemas y brotes, callos y nodos, cultivo de embriones y protoplastos.

Al efectuar la propagación de plantas a partir de yemas y brotes jóvenes, las mutaciones espontáneas que se pueden presentar son mínimas, ya que estos resultan directamente de meristemos establecidos y están sujetos a

bajos niveles de variación.

La micropropagación permite la reproducción de miles de plantas por metro cuadrado y tiene la ventaja de que, si el ejemplar parental es sano, todas las plantas que se produzcan a partir de él, son sanas. Además, permite adquirir descendencia genéticamente similar. Esto asegura la homogeneidad de la producción (7).

Es así, como el campo de la biotecnología ha brindado una excelente herramienta, como es la micropropagación, para producir grandes cantidades de plántulas que consigan abastecer viveros y cultivos en proporciones tan amplias como la demanda.

Los estudios en rosas en cultivo de tejidos vegetales son escasos, por lo cual este trabajo plantea establecer cultivos *in vitro* de *Rosa sp* a partir de yemas axilares, evaluar concentraciones de hormonas para la fase de calogénesis para posteriores investigaciones.

## Materiales y Métodos

### Área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de la Facultad de Ciencias Agroindustriales de la Universidad del Quindío.

### Selección del material

El material vegetal de *Rosa sp* fue seleccionado de acuerdo a los siguientes criterios

- Tallos de rosa sanos y vigorosos
- Tallos con presencia de yemas axilares

Este material fue suministrado por el vivero las “Matas” ubicado en el kilómetro 3 vía Armenia – Circasia.

Una vez seleccionadas las yemas axilares se procedió a realizar la desinfección: lavado en solución de hipoclorito de sodio comercial al 10 v/v durante 10 minutos, seguido de un enjuague de 2 minutos con agua destilada, inmersión en una solución de etanol al 70 v/v durante 10 minutos, se realizó un enjuague de 2 minutos con agua destilada; después se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5 v/v durante 5 minutos, seguido de un enjuague de 2 minutos con agua destilada; finalmente se sumergieron en Tween al 5% durante 5 minutos y se

realizó el respectivo enjuague con agua destilada.

### Fase de laboratorio

La fase experimental se llevó a cabo basándose en las etapas descritas por Murashige y Skoog (8). Las cuales son: Establecimiento aséptico del material, multiplicación y enraizamiento, para cada una de estas etapas se describe el procedimiento a seguir.

### Fase de establecimiento.

En la etapa de establecimiento se utilizó el medio Murashige y Skoog 100% (8), adicionado con myo-inositol 0,1mg/L, ácido ascórbico 0.1mg/L, tiamina 2mg/L, sacarosa 30g, benzylaminopurina (BAP) 4mg/L, kinetina 3mg/L, ácido indol-acético (AIA) 3mg/L, y Agar sigma 6 g; ajustando el pH a 5,8. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120°C bajo 15 lb de presión.

En condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar con la ayuda de pinzas y bisturí, se procedió a extraer los primeros primordios, para posteriormente introducir una yema en cada frasco (100 unidades de explantes) los cuales contenían 20 ml del medio de cultivo gelificado con Agar-Agar, estos se conservaron en la cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C bajo luz blanca fluorescente, hasta su brotación.

Después del establecimiento se hizo un seguimiento semanal y se tomaron los siguientes datos.

- Número de explantes vivos
- Número de brotes
- Contaminación

### Multiplicación y enraizamiento

Una vez obtenido los brotes se realizó la multiplicación de los explantes; se pasaron al medio de multiplicación, agregando BAP y ANA, teniendo así dos tratamientos (Tabla 1).

En cada tratamiento se colocaron 20 brotes con una altura promedio de 5 mm para un total de 40 brotes.

**Tabla 1.** Hormonas a evaluar para la fase de multiplicación y enraizamiento

Tratamiento A	Tratamiento B
Murashige y Skoog 100%, BAP 2 mg /L+ ANA 3 mg/L	Murashige y Skoog 100%, BAP 3 mg/L+ ANA 1mg /L
Agar 5,6 g	Agar 5,6g
Azúcar 30 g	Azúcar 30g

En esta etapa se evaluaron

- Altura
- Número de hojas
- Formación raíz.

#### Establecimiento de Callogénesis a partir de hoja

Para el establecimiento de callo se tomaron muestras de hojas de rosa. Estas fueron previamente lavadas con agua y jabón: Se les realizó el siguiente protocolo de desinfección: 10 minutos en agua con hipoclorito comercial al 5 más 2 gotas de Tween, se lavaron y se sumergieron en alcohol al 70, se lavaron y se dejaron 5 min en hipoclorito al 5, luego en cabina se realizó un último enjuague y se cortaron porciones de hojas de 3mm<sup>2</sup>, en total se seleccionaron 20 explantes para cada tratamiento (tabla 2).

**Tabla 2.** Hormonas a evaluar para fase de formación de callo a partir de hoja

Tratamiento 1	Tratamiento 2
Murashige y Skoog 100%, BAP 2 mg/L + 5 mg 2,4-D	Murashige y Skoog 100%, BAP 2 mg/L + 5 mg picloram
Agar 5,6 g	Agar 5,6g
Azúcar 30 g	Azúcar 30g
pH 6,0	pH 6,0

Las hojas sembradas para cada tratamiento se colocaron en cuarto de crecimiento con 12 horas de luz (intensidad de luz de 60 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) a 25±1oC de temperatura.

Se cuantificó el número de explantes que formaron callo en los distintos tratamientos, durante las primeras 4 semanas de cultivo (30 días).

La variable a evaluar fue:

- Formación de callo

#### Análisis de los datos

Para la fase de establecimiento se realizó un análisis de

varianza descriptivo; y se evaluaron las siguientes variables

- Número de explantes vivos
- Número de brotes
- Número de explantes contaminados.

Para la fase de multiplicación, enraizamiento y obtención de callo se empleó una Anova en donde se evaluó el enraizamiento, número de hojas y producción de callogénesis

Para la callogénesis se empleó un diseño estadístico completamente al azar, los datos fueron analizados con el software SPSS (SPSS Statistics 17) utilizando el test de varianza Anova y las diferencias entre las medias se determinaron mediante el test Tukey (p 0,05).

## Resultados

### Establecimiento yemas axilares de *Rosa sp*

Esta etapa se realizó un conteo del comportamiento de cada uno de los explantes de yemas axilares de *Rosa sp.*, en cuanto al número de explantes con brote, sin brote y contaminación (Fig. 1 y 2)



**Figura 1.** Fase de establecimiento de explantes de Rosa sp a partir de yemas axilares

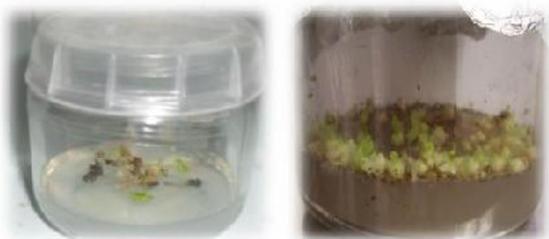


**Figura 2.** Variables medidas (Explantes vivos, Número de brotes, Contaminación) para fase de establecimiento.

En la figura 2, se observa que de 100 explantes (yemas axilares) sembrados, 16 no brotaron; 22 se contaminaron probablemente por contaminación endógena y 62 explantes si brotaron.

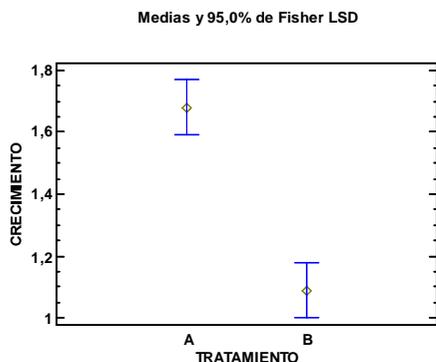
### Multiplicación y enraizamiento de brotes de *Rosa sp*

En esta investigación se evaluaron tanto multiplicación como enraizamiento en un solo medio, basados en la metodología propuesta por Ramírez y Angarita (9), en donde plantea que algunas especies como *Rubus glaucus*, el evaluar la multiplicación y enraizamiento en un mismo medio sería una opción para minimizar los tiempos de formación de explantes y posible aclimatación en campo (fig. 3)



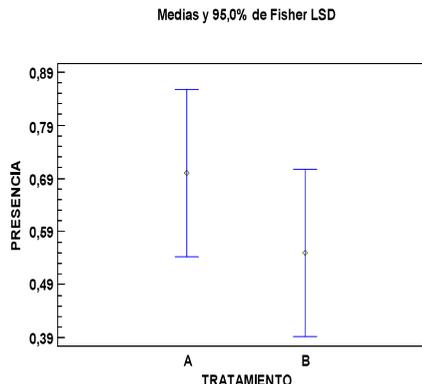
**Figura.3.** Multiplicación y enraizamiento de *Rosa sp*

De acuerdo al análisis de varianza se encontró que existen diferencias altamente significativas para la variable altura ( $P = 0,0000$ ), para determinar en cuáles medias son significativamente diferentes se aplicó la prueba de Kruskal–wallis, en donde existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas ( $P = 0,00000200783$ ), lo que muestra que el medio 1, es el óptimo para esta fase de multiplicación y enraizamiento de *Rosa sp*. (fig. 4)



**Figura. 4.** Altura de explantes en fase de multiplicación y enraizamiento. (Medio A BAP 2 mg /L + ANA 3 mg/L) (Medio B con BAP 3 mg/L + ANA 1 mg /L).

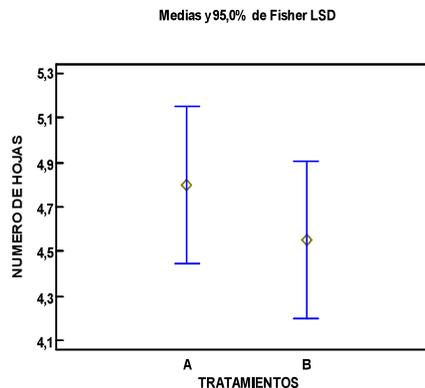
El promedio de presencia de raíz en el medio A, fue de 0.7, mientras que los explantes del medio B obtuvieron un promedio de raíz de 0.55, (fig. 5).



**Figura. 5.** Presencia de raíz en fase de multiplicación y enraizamiento.

El medio A obtuvo mejores resultados en las tres variables analizadas (altura, presencia de raíz, y número de hojas) en comparación con el medio B, lo que indica que las concentraciones de BAP 2 mg/L combinadas con ANA 3 mg/L son eficaces para el enraizamiento, elongación y multiplicación de la especie.

Con relación al promedio del número de hojas, el medio A presentó 4,8 hojas, mientras que en el medio B, el promedio de hojas fue de 4,5 (Fig. 6)



**Figura. 6.** Número de hojas en fase de multiplicación y enraizamiento.

### Callogénesis

Con relación a la formación de callos, estos se empezaron a formar a partir de la cuarta semana en los bordes del explante de hoja algunos callos presentaron caracte-

rísticas proembriogénicas.

No obstante, se considera que el cultivo de callos puede constituir un principio de variación genética que tiene la ventaja de permitir multiplicar rápidamente el material vegetal, García (10).

En esta fase se evaluaron dos medios, el medio A con BAP 2 mg/L + 5 mg/L 2,4-D y el medio B con BAP 2 mg/L + 5 mg picloram, el medio A tuvo un promedio de callos formados de 0,7; mientras que el medio B tuvo un promedio de 0,4, lo que pone de manifiesto la mayor efectividad de la 2,4-D en comparación al picloram, cuando se combinan con la misma dosis de una citoquinina BAP.

Los reguladores de crecimiento primordialmente auxinas y citoquininas son los promotores más utilizados en la inducción de embriogénesis somáticos en cultivo de tejidos vegetales.

En ambos medios se mostró una aparición de callos friables, compactos y de color café, que se asimilaban a callos necrosados, algunos callos con esta apariencia muestran brotes callogénicos después de un tiempo de sembrados. En esta investigación los callos obtenidos se mantienen en el laboratorio para posteriores estudios en el área de embriogénesis.

En *Rosa sp.*, se ha investigado el proceso de callos a partir de explantes de pétalos en diferentes medios, resultando los más efectivos para la formación de callos: el MS con ANA BAP y 2,4-D. (11).

El análisis de varianza para las variables presencia de raíz (valor  $p = 0,3398$ ), número de hojas (valor  $p = 0,4775$ ) y formación de callos, (valor  $p = 0,1964$ ), demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, cualquiera de los dos medios es óptimo en la fase de multiplicación y enraizamiento de *Rosa sp.*

## Discusión

La contaminación presentada en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de rosa se debe principalmente a bacterias, investigadores como Ramírez y Angarita (9), argumentan que las bacterias endógenas son habituales en cultivos *in vitro* iniciados a partir de explantes tomados de plantas adultas crecidas en campo y afectan tanto al crecimiento de brotes como a la organogénesis

de brotes y raíces adventicias.

Una solución para evitar dicha contaminación es la aplicación de antibióticos para mejorar las fases siguientes.

Con relación a la Multiplicación y el enraizamiento de brotes de *Rosa sp.*, Lomtadze *et. al.*, (11), en su trabajo con el níspero exploraron diferentes concentraciones de (BAP) y (ANA) y sus combinaciones. La citocianina a una baja concentración, provoca la morfogénesis apical, que se expresa menos con la adición de altas concentraciones de BAP al medio de cultivo. En cuanto a ANA, afirman que altas concentraciones de la auxina, traen callogénesis más activa; aunque esta variable no fue medida en esta fase, si pudo influir para darle crecimiento en cuanto a las alturas promedio del medio A con 3mg/L en comparación a las del medio B con 1 mg/L.

Pérez (12), observó que con el aumento del BAP se suscitó un decrecimiento en la emisión de raíces, lo cual debió estar dado por un desbalance en la proporción auxina-citoquinina, favorable a la citoquinina que interviene en el crecimiento apical de los brotes, procedimiento que se pudo dar también en este ensayo cuando el medio B presento menos raíces teniendo una mayor concentración de la citoquinina que el medio A.

Martínez (13), concluyó que la relación de BAP/ANA que sería efectiva para una organogénesis en embriones de *C. elegans*, se encuentra en un rango de concentraciones de 0,5 a 1,0 mg/L<sup>-1</sup> de BAP y no menos de 0,1 mg/L<sup>-1</sup> de ANA en donde la proporción siempre debe ser mayor de citoquinina/auxina; concentraciones mucho menores a las utilizadas en este proceso, sin embargo, la diferencia de especies puede influir y es así como varían los requerimientos para cada uno.

Por otra parte, Moncada *et. al.*, (14), afirman que el BAP y el 2,4-D juntos promueven el desarrollo de callos con raíces y con potencial embriogénico; las concentraciones bajas de estos 2 reguladores de crecimiento inducen un mayor desarrollo de callos embriogénicos.

La respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar simplemente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Linz, citado por Roca) (15).

Según Data (16) y Esitken (17), en *Rosa sp.*, se ha in-

vestigado el proceso de callos a partir de explantes de pétalos de siete cultivares, en distintos medios, resultando los más efectivos para la formación de callos: el MS con 1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA y el Schenk y Hildebrandt (SH) con 2 mg/L de 2,4 D y 1 mg/L de BA, sin embargo, no se observó embriogénesis somática ni organogénesis en ninguno de los medios.

## Conclusiones

Para multiplicación y enraizamiento *in vitro* de Rosa (*Rosa sp.*). El medio establecido más recomendado es el medio (A), el cual contiene (BAP 2 mg/l + ANA 3 mg/l) con promedios de altura, presencia de raíz y número de hojas

Para la inducción de callo a partir de hoja en Rosa (*Rosa sp.*). El mejor medio es el A (BAP 2 mg/l + 5 mg 2,4-D) con promedio de formación de callo de 0,7 (70%).

La callogénesis de Rosa a partir de hoja, resulta ser un instrumento muy útil para conseguir callos pro embriogénicos y posteriormente realizar estudios sobre embriogénesis somática, herramienta importante para los nuevos avances en biotecnología vegetal.

## Agradecimientos

Vicerrectoría de investigaciones de la universidad del Quindío, Facultad de Ciencias Agroindustriales.

---

## REFERENCIAS

- Arévalo J, (2011), “La rosa”, consultado de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/229/4/03%20agp%20107%20capitulo%20ii.pdf>
- Erazo, H. (2011). Rosas-Rosales. Descripción & Características. Obtenido de Plantas y Jardín: Pasión por la jardinería: <http://plantasyjardin.com/2011/07/rosas-rosales-descripcion-caracteristicas/>
- Bale, S y Durham, R. (2011). Rosas. The Arboretum: Horticulture; T. Phillips, Plant and Soil Sciences; L. Townsend, Entomology.
- Linares H, (2004) “Manual del participante El cultivo del rosal” <http://www.akerudigital.com/descargar/cultivorosal.pdf>
- Tenjo F, Montes E, Martínez J, (2006), “Comportamiento reciente (2000-2005) del sector floricultor colombiano <http://www.banrep.gov.co/docum/ftp/borra363.pdf>
- Jiménez, E. A. (1998). Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 400 p.
- Medina, M. (2005). Organismos vegetales. Fundamentos de la organografía vegetal. (On line). [http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica\\_biologia/docencia/FMBvirtual/Micropropa/Micvegetal.htm](http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/Micropropa/Micvegetal.htm). (05 abril 2007).
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Ramírez, del Castillo A., Angarita, Zerda A. (1990). Estudios preliminares para la propagación clonal “*in vitro*” de mora *Rubus glaucus* Benth. *Agron Colomb*. 1 (7):17-25.
- García, M. (1999). Metodología para la propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm. Tesis de Maestría; Universidad de La Habana. 70 h.
- Lomtadze N, Zarnadze N, Alasania N Y Zarnadze R. (2009), “Morfogénesis de níspero (*eriobotria japonica* l.) *In Vitro*”; se consultó de <http://www.science.org.ge/3-1/Lomtadze.pdf>
- Pérez J, (2007), “Efecto de algunos reguladores del crecimiento y el Fitomás-E en la micropropagación de *Musa sp.* Variedad FHIA-18 (AAAB)” consultado de <http://www.monografias.com/trabajos55/reguladores-de-crecimiento/reguladores-de-crecimiento2.shtml>
- Martínez A, (2007), “Estudio de inducción de embriogénesis somática y organogénesis en embriones cigóticos de xate, *Chamaedorea elegans* Mart.” Consultado de [http://biblioteca.usac.edu.gt-tesis/06/06\\_2559.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt-tesis/06/06_2559.pdf)
- Moncada E, Vielma M y Mora A, (2007), “Inducción *in vitro* de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arábica* L. Variedad Catuaí Amarillo”, consultado <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/229/4/03%20agp%20107%20capitulo%20ii.pdf>

tream/123456789/16922/2/articulo6.pdf

- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: Roca, W. y Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Publicación. p. 1-17.
- Datta, S. K. *et al.* (2002). *In vitro* petal culture and callus formation in *Rosa* species. *Indian J Agr Sci.* 72 (5): 271-276.
- Esitken, A. y Ercisli, S. (2001). The effect of some hormones on the callus induction in *Rosa canina* and *Rosa dumalis in vitro*. *Ziraat Facultesi Dergisi, Atatürk Üniv. Ziraat fak. Derg.* 32(2): 125-128. <https://dergipark.org.tr/download/article-file/34458>